

DNA の 基 礎 的 研 究

－ 化学成分の検出・定量と抽出法の検討 －

田 村 仁

DNA (デオキシリボ核酸) を化学の立場から教材化するため、その基礎的検討を行った。その結果、DNAの化学成分であるリン酸、デオキシリボースは、簡単な呈色反応で検出・定量できること、4種類の塩基については紫外線で検出できるが、生物種に特有な塩基組成も決定できることが確認された。また、高速遠心を用いなくても約2時間で、生体材料から糸状DNAを抽出できることがわかった。これらの方法で魚野川のサケ(白子)からDNAを抽出し、その塩基組成を分析したところ、GC含量は文献値通り43%であった。

1. はじめに

生命現象の基本とも言える遺伝現象が、DNA (デオキシリボ核酸) の物理・化学的挙動によって展開されているという認識は、自然科学の発展においても画期的なものであり、我々の興味を深くそその内容である。遺伝子の本体とされるDNAは、近年人工合成やつぎはぎ・交換が技術的にも可能となり、その扱い方が世界的な問題となっているだけでなく、遺伝子産業として投機の対象ともされている。

一方、化学教育の目的の一つとして、「健全な物質観や自然観を育成し、物質の利用に際して総合的な見方や判断ができること」が期待されている。従って、DNAの学習を生物分野に限定するべきではなく、化学分野においても物質としての基本認識を与える必要があると考えて、その基礎的研究に着手した。

そこで、まずDNAの化学構造(図1)に着目し、市販のDNAを用いて、リン酸、デオキシリボース(五炭糖)、4種類の塩基; アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の検出・定量法を検討する。一方、生体材料からDNAを抽出するこれまでの方法は、高速遠心機を用いたり、抽出そのものに長時間を要するなど、学校現場で利用しにくい問題点がある。よって、それらを解決する簡単な抽出法についても検討を加える。

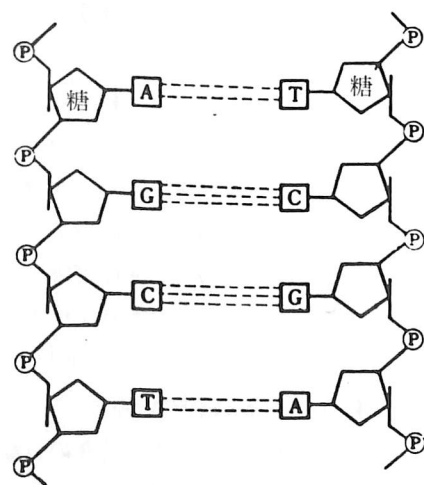


図1 DNAの化学構造¹⁾

(P) : リン酸 糖 : デオキシリボース

2. DNAの化学成分

(1) デオキシリボース(五炭糖)の検出・定量

糖には、様々な呈色反応があるが、ここでは青色を呈するジフェニルアミン反応²⁾を採用した。その理由は、表1に示したように試薬や操作が簡単であり、しかも呈色

が安定しているからである。また、可視部の 595 nm に吸収ピークがあるので、市販 DNA (図 2) を用いて図 3 のような検量線をつくれれば、学校現場にある光電比色計で DNA 溶液を定量にすることが可能である。さらに、この反応はデオキシリボースに特異的であるため、試料中に RNA (リボ核酸) が含まれていても、DNA だけを検出・定量できる点もすぐれている。

260 nm の吸光度から、DNA 濃度 $210 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ とされた溶液は、本法においても $213 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ と一致しており、その信頼性が確認された。

(2) リン酸の検出・定量

リン酸 H_3PO_4 が、モリブデン酸と反応して錯体をつくり、還元されると青色を呈することは良く知られている。ここでは、少量の濃硫酸と濃過酸化水素水を用いて DNA を灰化し、硫酸鉄 (II) アンモニウム (モール塩) で還元する方法を用いた。DNA には 8.5 ~ 9.3 % のリンが含まれるとされているが、表 2 に示した分析結果はこれと良く一致している。参考までに本法でマッチ箱の摩擦面を分析したところ、約 30 mg のリンが検出された。本法は天然物中のリンの検出に広く利用できると思われる。

(3) 塩基の検出と塩基組成の決定

① 加水分解 - ギ酸分解法³⁾

一端を閉じたガラス管 (内径 6 mm、長さ約 12 cm) に 10 mg の DNA を入れ、98 % ギ酸 0.5 ml を注入した後バーナーで封管する。これを 175°C で 30 分間加熱し、氷水等で十分冷やしてから開管する。ギ酸の分解によって内部が高圧になっているので、先端の細い部分にヤスリで小穴を開けてガス抜きをしてから全体を開管する (眼鏡着用)。これに水 0.5 ml を注入・攪拌した後、ろ紙でろ過したものを分析試料とする。

② クロマトグラフィによる塩基の分離・検出

ろ紙や薄層 (TL) を用いた核酸の加水分解物のクロマトグラフィでは、一般に同じ展開液が使用されており、その使用例もいろいろと報告されている。ここではイン

表 1 ジフェニルアミン反応による DNA の定量

DNA 溶液 1 ml ($50 \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$)
↓
試薬* 2 ml を加えて攪拌
↓
沸騰水浴上で 10 分加熱し、放冷
↓
同時処理ブランク溶液に対して、595 nm の吸光度を測定
↓
検量線での読み取り

* 使用直前、1 g のジフェニルアミンを特級水酢酸 100 ml に溶かし、特級濃硫酸 2.75 ml を加えたもの。

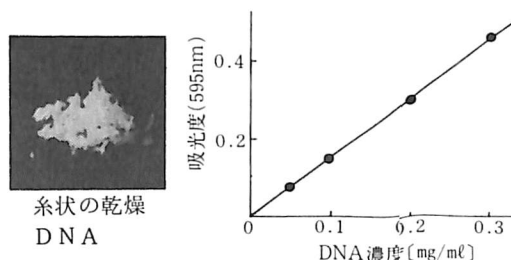


図 2 市販 DNA 図 3 DNA の検量線

表 2 核酸中のリン (P) の定量

測定試料	P の重量	含有率
ニシン DNA 10 mg	0.93 mg	9.3 %
イースト RNA 10 mg	0.92 mg	9.2 %

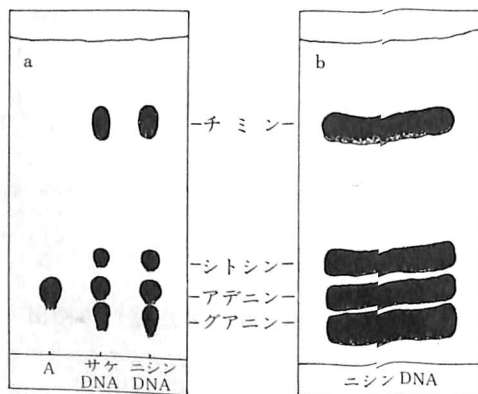


図 4 DNA 加水分解物の薄層クロマトグラム
a : R_f 決定用 b : 検出用

プロパノール：濃塩酸：水（64：14.6：水で全容100）を用いた。また、ろ紙はワットマンNa 1，薄層はセルローズ薄層プレート（フナコシ薬品，アビセルSF）を利用した。スポットの検出は，硝酸銀，pH指示薬，ヨウ素等の噴霧法を検討したが，うまくいかず，短波長（260 nm 付近）の紫外線を照射する方法を用いた。市販されている紫外線照射器がなくても，装置を自作することができる⁴⁾。ポリビニルアルコールのフィルムを作り，それにヨウ素ヨウ化カリウムを作用させると濃紺色を呈する。これをフィルターとして15Wの殺菌灯に取り付けたところ，市販の装置以上にスポットがはっきりと見えることがわかった。

ペーパークロマトグラムの4個のスポットは，移動速度の速い順に R_f 値が，0.79，0.42，0.32，0.22 となり，文献値²⁾や後で述べる吸収スペクトルからそれぞれT，C，A，Gの各塩基と同定された。TLを用いたところ，展開時間は約10分の1（3時間未満）に短縮された上スポットも見やすく，ペーパの場合とよく似たクロマトグラム（図4）が得られた。各塩基の R_f 値はT：0.74，C：0.36，A：0.25，G：0.16であった。

③ 塩基組成の決定

抽出用のクロマトグラム（図4 b）の各スポットを，0.01 N 塩酸で20時間振盪（室温）して抽出し，それらを分光光度計（日立200-10型）で測定した結果が，図5の吸収スペクトルである。それらを基に（吸光度）=（モル吸光係数）×（モル濃度）なる関係式²⁾から各塩基のモル濃度を決定し，さらに塩基組成を求めた（表3）。結果は，文献値¹⁾とも良く一致しており，DNA中の各塩基がGに対してはC，Aに対してはTという形で相補的に結合していることが示唆された。

3. 生体材料からのDNAの抽出

高速遠心を行わず，できるだけ短時間に糸状DNAを抽出するため，界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）⁵⁾を用いる方法とフェノール処理法²⁾を組み合わせた

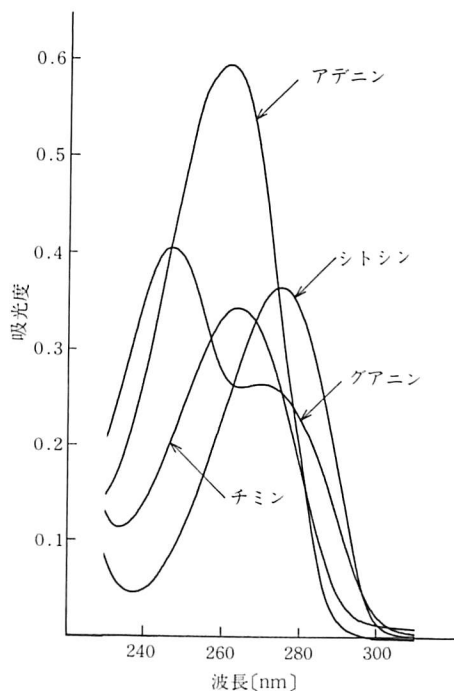


図5 塩基の吸収スペクトル（pH 2）

表3 ニシンDNAの塩基組成

	G	A	C	T
260 nmでの吸光度	0.88	1.83	0.76	0.97
モル吸光係数 $\times 10^{-3}$	8.1	12.7	6.2	7.4
ミリモル濃度	0.11	0.14	0.12	0.13
モル% *	22	28	24	26
モル% **	20	28	24	28

* TLから抽出 ** ろ紙から抽出

表4 糸状DNAの抽出法

15gの白子を解凍しつつ，細かく切断
 ↓
 60mlの0.15M NaCl-SC*を加えながら冷やしたミキサーで，3分間摩砕
 ↓
 3,000 rpmで，10分間遠心
 ↓
 氷水で冷やしながら，沈殿を約270mlの0.15M NaCl-SCに良くけん濁
 ↓
 スライダックス（30V程度）でミキサーをゆっくり回転させながら，5% SDS** 30mlを少しずつ加え，20分間搅拌を継続
 [次ページへ続く]

抽出法を検討した。生体材料としては、昨年の11月29日魚野川で採取したサケの白子を用いる。具体的な方法は表4に示したが所要時間は2時間である。SDSとフェノールの使用は共にタンパク質を変性除去するためであり、NaCl濃度を1MとしたのはRNAを沈殿させて、DNAを水槽に選択的に溶出させるためである。図6にも示したように、フェノール処理後軽く遠心すると、変性したタンパク質が間層やフェノール層に集まる。また、エタノールで沈殿させたDNAをガラス棒で巻き取る操作は、RNAや多糖類などの不純物を取り除く役割を果たしている。この操作は、DNAを繊維(糸)状物質として肌で感じ取れるので、生徒にも是非実験させたい場面である(図7)。

抽出したDNAの純度を、260nmでの吸光度及びジフェニルアミン反応で調べたが、前半のSDS処理後のエタノール沈殿(1M NaCl可溶性分画)では約50%、フェノール処理後では約90%であることがわかった。なおフェノールは腐食性が強いので、顔や手足につけないよう十分注意を要する(眼鏡着用が望ましい)。

こうして得られたサケのDNAの塩基組成を分析したところ、各塩基のモル%はG:20%, C:23%, A:30%, T:27%で、GC含量は43%となった。これらの値は文献値と極めて良く一致しており、本法のような簡単な抽出法でも比較的純度の高いDNA標品の得られることがわかった。

4. おわりに

実験を中心にしたDNAの教材化が十分可能であることがわかった。今後は、化学分野における具体的な教材化と、抽出法の一層の単純化を検討したい。

今回の研究に際し、御指導を頂いた新潟大学理学部生体物理化学教室の諸先生に深くお礼申しあげる。

参考文献

- 1) J. N. デビッドソン(石田ら訳): 核酸の生化学, 共立出版(原著1965, 訳1968)
- 2) 日本生物物理学会編集: 続生物物理学講座6, 核酸蛋白質研究法I核酸, 吉岡書店(1968)
- 3) 竹村彰祐: ペーパークロマトグラフィによる核酸の塩基組成分析. 蛋白質核酸酵素, 9, pp 1342-1344, (1964)
- 4) 宮崎正澄: 自作紫外線ろ過板. 蛋白質核酸酵素, 5, pp 314 (1960)
- 5) 東京大学理学部生物化学実験研究会編: 生物化学実験法, 朝倉書店(1964)

[表4の続き]

NaCl 14.4 g (1 M NaClになるように)を加えて, 5~10分さらに搅拌

↓

1 M NaCl-SCを等容加えて搅拌

↓

等容の冷フェノール(1 M NaCl-SCに飽和させておく)と共に三角フラスコに入れ, 氷水で冷やしながら30分間強く振盪

↓

3,000 rpmで20分間遠心し, 水層を静かに取る(スポイトまたは大注射器使用)

↓

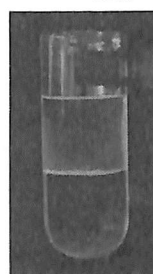
約2倍容の冷エタノールに注ぎ, 糸状の沈殿をガラス棒で巻き取る

↓

冷エタノールで洗浄後乾燥するか, エタノール沈殿のまま保存

* SCはクエン酸ナトリウムの略

** 45%エタノールに溶かす



——水層(DNA)
——変性タンパク質
——フェノール層

図6 フェノール処理後遠心した時の様子



図7 DNAを巻き取る